

УДК: 577.12.577.112.577.2

Связь между возрастными изменениями белково-полисахаридного состава и биомеханическими свойствами кожи
Аббас Эль Та'алу, Ю.Г.Кот, Е.Э.Перский, А.Н.Пономаренко

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Изучено влияние возрастных изменений удельного содержания коллагена, эластина и гликозаминогликанов в коже на её механические свойства у крыс линии *Wistar* 1-, 3-, 12- и 24-месячного возраста. В течение изученного периода онтогенеза прочность кожи на разрыв непрерывно повышается. В то же время её модуль Юнга в области упругой деформации снижается в период от 1 до 3 месяцев, после чего вновь повышается, а максимальное относительное удлинение в момент разрыва, повышаясь в период от 1 до 3 месяцев, в дальнейшем непрерывно снижается. Показано, что эти особенности упругих и вязких свойств кожи в раннем постнатальном онтогенезе коррелируют с возрастными изменениями отношений концентраций коллаген/эластин и коллаген/гликозаминогликаны.

Ключевые слова: *возраст, соединительная ткань, биомеханические свойства, коллаген, эластин, гликозаминогликаны.*

Зв'язок між віковими змінами білково-полісахаридного складу і біомеханічними властивостями шкіри
Абас ЕльТа'алу, Ю.Г.Кот, Є.Е.Перський, О.М.Пономаренко

Вивчено вплив вікових змін питомого вмісту колагену, еластину та глікозаміногліканів у шкірі щурів лінії *Wistar* 1-, 3-, 12- і 24-місячного віку. На протязі дослідженого періоду онтогенезу міцність шкіри на розрив безперервно підвищується. В той же час її модуль Юнга в області пружної деформації знижується в період від 1 до 3 місяців, а максимальне відносне подовження в момент розриву, підвищуючись у період від 1 до 3 місяців, в подальшому безперервно знижується. Показано, що ці особливості пружних і в'язких властивостей шкіри в ранньому постнатальному онтогенезі корелюють з віковими змінами відношення концентрацій колаген/еластин і колаген/глікозаміноглікани.

Ключові слова: *вік, сполучна тканина, біомеханічні властивості, колаген, еластин, глікозаміноглікани.*

Relationship between changes in protein-polysaccharide composition and biomechanical properties of skin
Abbas El-ta'alu, Yu.G.Kot, Ye.E.Persky, A.N.Ponomarenko

The effect of age-related changes in the relative contents of collagen, elastin, and glycosaminoglycans of skin on its mechanical properties in 1-, 3-, 12- and 24-months old *Wistar* rats was investigated. Within the studied period of ontogenesis, hardness of skin continuously increases. At the same time, its Young's module in the region of elastic deformation decreases within the period from 1 to 3 months, after which it increases again, maximal relative elongation at the time of deformation increases within the period from 1 to 3 months and further continuously decreases. It has been shown that these elastic and viscous peculiarities of the skin at early postnatal ontogenesis correlate with age-related changes in the concentration ratios collagen/elastin and collagen/glycosaminoglycans.

Key words: *age, connective tissue, biomechanical properties, collagen, elastin, glycosaminoglycans.*

Введение

Изменения биомеханических свойств соединительной ткани в онтогенезе являются одной из важнейших причин возрастного нарушения её функциональных свойств. Эти изменения заключаются в увеличении жёсткости и уменьшении степени растяжимости соединительной ткани, а у некоторых её разновидностей – кожи, сухожилий, фасций – ещё и в повышении прочности (Никитин и др., 1977; Oxlund, 1986).

Естественно, что такие изменения механических свойств должны в значительной степени определяться возрастными изменениями содержания основных конструкционных биополимеров соединительной ткани – фибриллярных белков и гликозаминогликанов (ГАГ).

Несмотря на большое количество данных в этой области (Зимницкий и др., 2004; Waller, Maibach, 2006), работ, посвящённых выяснению непосредственного влияния белково-

полісахаридного складу на біомеханічні властивості з'єднаної тканини в онтогенезі, практично не вивчені.

В даній роботі вивчена залежність біомеханічних властивостей шкіри мишей від вікових змін у її дермі загального вмісту колагену, еластину і глікозаміногліканів.

Объект и методы исследований

Исследования проведены *in vitro* на коже 1-, 3-, 12- и 24-месячных крыс-самцов линии *Wistar*.

При проведении экспериментов придерживались правил обращения с животными в соответствии с международными принципами Европейской конвенции «По защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Европейская конвенция ..., 1998) и норм биомедицинской этики в соответствии с Законом Украины «Про захист від жорстокого поводження».

Животных усыпляли тиопенталом натрия (Greene, 2002), а затем декапитуировали. Образцы кожи 20 × 5 мм с длинной стороной вдоль спины очищали от подкожно-жирового слоя и волосяного покрова.

Механические свойства дермы кожи характеризовали по величинам её прочности на разрыв (σ_p), модуля Юнга в области упругой деформации (E) и предельной относительной деформации (ϵ).

Измерения проводили в физиологическом растворе для теплокровных животных на установке, записывающей в автоматическом режиме зависимость абсолютного удлинения образца от приложенного напряжения (Персский та ін., 2008). Образцы кожи нагружали до момента разрыва и отмечали соответствующее этому моменту напряжение. По кривой зависимости удлинения от напряжения на ленте самописца определяли предельное удлинение и рассчитывали относительное удлинение образца в момент разрыва по формуле:

$$\epsilon = (\Delta l / l_0) \times 100\% \quad (1), \text{ где:}$$

ϵ – относительное удлинение,

l_0 – начальная длина образца в мм,

Δl – удлинение образца в момент разрыва в мм.

Кривые напряжение–деформация для каждого образца строили, снимая с ленты самописца данные о величине удлинения под действием соответствующего напряжения. Модуль Юнга образцов в области упругой деформации рассчитывали по формулам:

$$E = \sigma / \epsilon \quad (2),$$

$$\sigma = P / S \quad (3), \text{ где:}$$

E – модуль Юнга в МН/м²,

σ – напряжение в МН/м²,

P – предельная нагрузка в момент разрыва в МН,

S – площадь поперечного сечения образца в м².

Для измерения содержания белков и гликозаміногліканів в шкірі її образцы обезжиривали ацетоном в течение 24 часов, а затем диэтиловым эфиром в течение 24 часов. Обезжиренные образцы кожи высушивали и растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния.

Для определения коллагена и эластина их разделяли, используя различную способность этих белков экстрагироваться щелочами при нагревании. Порошок кожи заливали раствором 0,1 N NaOH, прогревали на водяной бане при 100°C в течение 15 минут, после чего центрифугировали при 1500 g 20 мин. При этом коллаген переходит в надосадочную жидкость, а эластин остается в осадке (Mecham, 1981).

Концентрации обоих белков рассчитывали по соответствующему содержанию в них гидроксипролина, который определяли методом (Утевская, Персский, 1982).

Для определения глікозаміногліканів, що містяться в порошках, білки гідролізували колагеназою з *Clostridium histolyticum*, тип I, Sigma-Aldrich, 200 ед./мл в течение 24 часов при 37°C и постоянном перемешивании в натрий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 mM CaCl₂, 0,33 mM MgCl₂ (Nagai et al., 2004).

Низкомолекулярные пептиды, вышедшие в раствор после ферментативной обработки, осаждали 6% ТХУ при 4°C. Осадок отделяли центрифугированием (4500 g, 15 мин). ГАГ из супернатанта осаждали добавлением 2% хлористого цетилпиридиния (1:10) (Merck). Осадок

гликозаминогликанов отделяли центрифугированием (4500 g, 15 мин), трижды промывали 95% этанолом, насыщенным NaCl при 4°C, суспендировали в 3 мл 10% раствора ацетата натрия, перемешивали и смесь фракционировали для выделения отдельных ГАГ (Меркурьева, Гусева, 1974).

Фракционирование проводили методом ионообменной хроматографии на термостатированной при 28°C колонке размерами 0,9 × 50 см, наполненной смолой Dowex 1 × 2 (Cl⁻-форма, 200–400 меш, Sigma) и забуференной 0,2 M NaCl. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Элюцию проводили при помощи ступенчатого градиента концентраций NaCl (Меркурьева, Гусева, 1974; Hardingham, 1998). В предварительных экспериментах с использованием стандартов гликозаминогликанов (Sigma-Aldrich) было показано, что в таких условиях элюции их выход с колонки составляет 87–100 %.

Гиалуроновую кислоту, гепарансульфат и хондроитинсульфаты определяли, измеряя с помощью карбазоловой реакции содержание D-глюкуроновой кислоты. Содержание дерматансульфата оценивали по количеству L-идуроновой кислоты, которую измеряли орциновым методом (Слущкий, 1969).

На основе полученных данных были рассчитаны коэффициенты корреляций между изменениями отношений коллаген/эластин и коллаген/ΣГАГ и биомеханических свойств дермы кожи.

В необходимых случаях численные результаты измерений и расчётов обрабатывали статистически (Гланц, 1998).

Результаты и обсуждение

Усреднённые по всем измеренным образцам кривые зависимостей напряжение–деформация кожи крыс разного возраста имеют сходную форму, однако отличаются динамикой роста показателя (рис. 1). В соответствии с этими кривыми по формулам (1)–(3) рассчитаны величины максимального напряжения и максимального относительного удлинения кожи в момент разрыва, а также модуля Юнга в области упругой деформации (табл. 1).

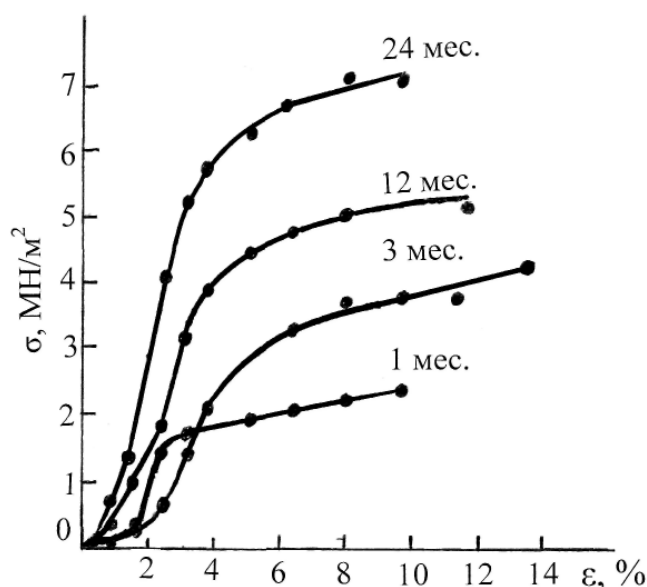


Рис. 1. Зависимость напряжение–деформация кожи крыс разного возраста

Как видно, прочность кожи на разрыв непрерывно повышается в течение всего изученного периода онтогенеза. В то же время модуль Юнга в области упругой деформации снижается в период от 1 до 3 месяцев, после чего вновь повышается. Максимальное относительное удлинение кожи в момент разрыва изменяется противоположным образом — повышаясь от 1 до 3 месяцев, в дальнейшем оно непрерывно снижается.

В соответствии с данными табл. 2 и 3, концентрации как основных опорных белков — коллагена и эластина, так и гликозаминогликанов, входящих и в состав протеогликанов, и в состав основного вещества дермы кожи, непрерывно повышаются в онтогенезе. Это повышение концентрации всех без

исключения конструкционных биополимеров в коже и является одной из главных причин возрастного повышения её прочности.

Таблица 1.

Возрастные изменения биомеханических свойств кожи крыс

Показатель	Возраст, мес.			
	1	3	12	24
σ_p , МН/м ²	2,40 ± 0,19	4,21 ± 0,44*	5,22 ± 0,37*	7,58 ± 0,43*
E, МН/м ²	9,46 ± 0,79	5,73 ± 0,91*	8,32 ± 0,87*	12,15 ± 1,10*
ϵ , %	10,43 ± 0,58	13,58 ± 1,24*	12,15 ± 1,06	10,00 ± 0,77

Примечание: в табл. 1–3: * – достоверно ($p < 0,05$) относительно контроля (1 мес.); $n = 4–5$.

Таблица 2.

Возрастные изменения содержания коллагена и эластина в коже крыс, мг/г сырой ткани

Белок	Возраст, мес.			
	1	3	12	24
Коллаген	9,40 ± 1,63	12,62 ± 0,95*	23,30 ± 1,4*	31,73 ± 2,8*
Эластин	0,79 ± 0,18	1,53 ± 0,25*	2,31 ± 0,41	2,40 ± 0,43

Таблица 3.

Возрастные изменения содержания ГАГ в коже крыс, мг/г сырой ткани

Тип ГАГ	Возраст, мес.			
	1	3	12	24
Гиалуроновая кислота	3,77 ± 0,14	5,07 ± 0,37*	7,84 ± 0,27*	8,60 ± 0,22*
Гепарансульфат	3,02 ± 0,14	3,73 ± 0,33*	7,19 ± 0,14*	11,14 ± 0,47*
Хондроитинсульфаты	4,83 ± 0,09	5,34 ± 0,55	7,80 ± 0,29*	12,81 ± 0,4*
Дерматансульфат	1,64 ± 0,07	3,53 ± 0,29*	5,57 ± 0,5*	6,38 ± 0,21*
Кератансульфат	1,14 ± 0,04	3,67 ± 0,24*	5,57 ± 0,31*	9,43 ± 0,32*
Сумма ГАГ	14,40 ± 0,03	21,63 ± 1,5*	33,97 ± 1,0*	48,36 ± 0,75*

Однако абсолютное увеличение концентрации не объясняет особенностей уменьшения модуля Юнга и увеличения растяжимости кожи в период от 1 до 3 месяцев.

Аналогичные особенности изменения механических свойств различных разновидностей соединительной ткани в раннем постнатальном онтогенезе были отмечены уже давно, но не получили сколько-нибудь логичного объяснения (Обысов, 1971; Пуриныш, Слуцкий, 1975; Viidik, 1973).

Несомненно, однако, что важную роль в этих особенностях играют возрастные изменения удельного вклада конструкционных биополимеров, определяющих различные стороны упругих и вязких свойств ткани в целом. В первом приближении этот вклад можно оценить по отношению концентраций соответствующих биополимеров в коже на разных этапах онтогенеза.

Для оценки этих отношений были выбраны: коллаген, определяющий туговязкую упругость и жёсткость кожи, эластин, определяющий её резиноподобные упругость и растяжимость, и общее количество гликозаминогликанов, от которых, в значительной степени, зависят вязкие свойства ткани (Обысов, 1971; Пуриныш, Слуцкий, 1975). Возрастные изменения обоих отношений имеют ту же особенность (табл. 4), что и изменения модуля Юнга и максимального относительного удлинения – они снижаются в период от 1 до 3 месяцев, повышаясь на последующих этапах онтогенеза.

Таблица 4.

Возрастные изменения отношений коллаген/эластин и коллаген/ΣГАГ в коже крыс

Показатель	Возраст, мес.			
	1	3	12	24
Коллаген/эластин	11,90	8,25	10,10	13,20
Коллаген/ΣГАГ	0,65	0,58	0,61	0,66

Приведены зависимости этих механических свойств от обоих отношений, представляющие собой прямые (рис. 2), а также коэффициенты корреляции между ними (табл. 5).

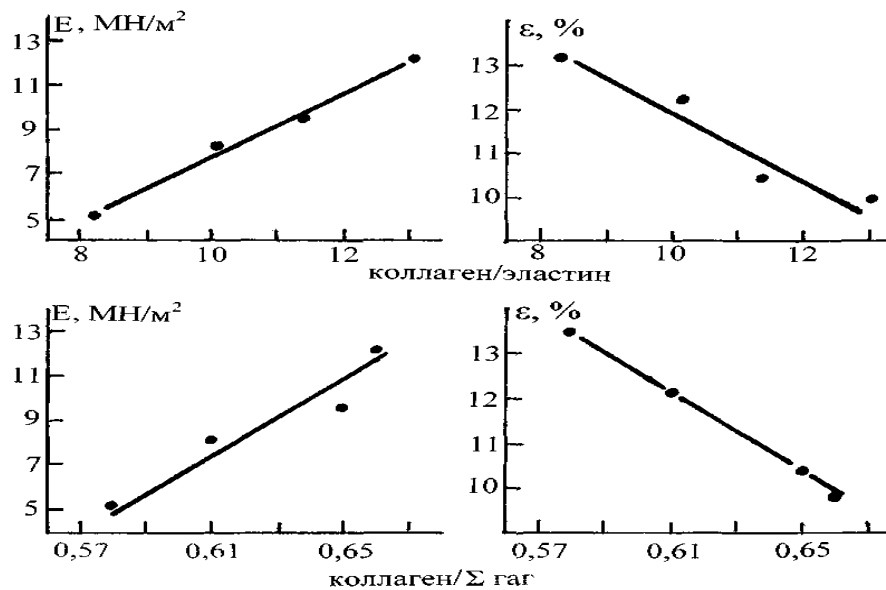


Рис. 2. Зависимости величин модуля Юнга и предельного относительного удлинения кожи крыс разного возраста от отношений коллаген/эластин и коллаген/ΣГАГ.

Таблица 5.

Коэффициенты линейной корреляции между механическими свойствами кожи и её белково-полисахаридным составом

Показатель	коллаген/эластин	коллаген/ΣГАГ
Е	0,978*	0,706
ε	- 0,868	- 0,727

Примечание: * – $p < 0,05$.

В соответствии с ними для обоих отношений существует высокая положительная корреляция с модулем Юнга и отрицательная – с максимальным относительным удлинением в момент разрыва. При этом отношение коллаген/эластин вносит больший вклад в возрастные изменения обоих механических свойств, чем отношение коллаген/ΣГАГ.

Выводы

1. С возрастом растет прочность кожи на разрыв, что объясняется увеличением содержания всех изученных биополимеров.
2. В 3-месячном возрасте наблюдается минимальная степень жесткости и максимальные значения относительного удлинения.
3. Соотношения коллаген/эластин, коллаген/ΣГАГ имеют минимальные значения в коже 3-месячных животных с последующим ростом показателя в онтогенезе. Этот факт согласуется с особенностями поведения значений модуля Юнга в тех же образцах.
4. Корреляционный анализ подтверждает зависимость величины модуля Юнга от соотношения коллаген/эластин, коллаген/ΣГАГ.
5. Рост значений модуля Юнга определяется в большей степени вкладом соотношения коллаген/эластин, чем коллаген/ΣГАГ.

Список литературы

Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459с.

- Европейская конвенция «По защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» // Совет Европы. – Протокол ETS №170. – Страсбург, 1998. [Электронный ресурс].
- Зимницкий А.Н., Башкатов С.А., Хушнутдинова С.Б. и др. Содержание и метаболизм гликозаминогликанов в органах и тканях белых крыс разного возраста // Биомед. химия. – 2004. – №50 (6). – С. 592–599.
- Меркурьева З.В., Гусева М.Р. Сравнительная оценка методов определения гликозаминогликанов // Лабораторное дело. – 1974. – №3. – С. 162–167.
- Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. – К.: Наукова думка, 1977. – 242с.
- Обысов А.С. Надёжность биологических тканей. – М.: Медицина, 1971. – 103с.
- Перський Є.Є., Буланкіна Н.І., Гоєнага М.В., Кот Ю.Г. Розробка методу управління синтезом структурних біополімерів сполучної тканини для використання в хірургії і ортопедії // Звіт про НДР №12-08. Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна. – 2008. – Харків. – 29с.
- Пуриныш И.Ж., Слуцкий Л.И. Исследования основных механических характеристик межпозвонковых дисков поясничного отдела позвоночника у человека в зависимости от их биохимического состава // Изв. АН Латв. ССР. – 1975. – №1. – С. 45–52.
- Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Л.: Медицина, 1969. – 375с.
- Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. – 1982. – №226. – С. 18–20.
- Greene S.A. Veterinary anesthesia and pain management secrets. – Hanley & Belfus Inc., 2002. – P.4242, 266.
- Hardingham T. Chondroitin sulphate and joint disease // Osteoarthritis Cartilage. – 1998. – Vol.6, suppl. A. – P. 3–5.
- Mecham R.P. Elastin biosynthesis: a look at the current scene // Connect. Tissue Res. – 1981. – Vol.8. – №3–4. – P. 155–160.
- Nagai N.A., Yunoki S., Saton Y. et al. Method of cell-sheet preparation using collagenase digestion of salmon atelocollagen fibrillar gel // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2004. – Vol.98, №6. – P.493.
- Oxlund H. Relationships between the biomechanical properties, composition and molecular structure of connective tissues // Connect. Tissue Res. – 1986. – Vol.15, №1–2. – P. 65–72.
- Viidik A. Functional properties of collagen tissues // Int. Rev. Connective Tissue Res. – 1973. – №6. – P. 127–215.
- Waller J.M., Maibach H.I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water and lipid content and structure // Skin Res. Technol. – 2006. – №12 (3). – P. 145–154.

Представлено: Є.О.Гордієнком / Presented by: Ye.O.Gordiyenko

Рекомендовано до друку: Н.І.Буланкіною / Recommended for publishing by: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 15.04.2010.

© Абас ЕльТа'алу, Ю.Г.Кот, Є.Є.Перський, О.М.Пономаренко, 2010

© Abbas El-ta'alu, Yu.G.Kot, Ye.E.Persky, A.N.Ponomarenko, 2010